

Rec'd PCT/PTO 10 SEP 2004

PCT/JP 03/02755

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

07.03.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

REC'D 05 MAY 2003

WIPO PCT

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 8月28日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-248910

[ST.10/C]:

[JP2002-248910]

出 願 人

Applicant(s):

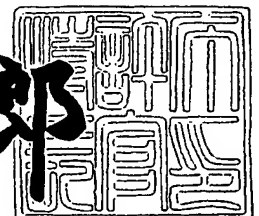
科学技術振興事業団

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 4月15日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3027319

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 PS02-1204

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県岡崎市竜美南 2 - 4 - 1 竜美が丘公務員宿舎 3
- 4 1

【氏名】 塚谷 裕一

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県岡崎市竜美南 2 - 4 - 1 竜美が丘公務員宿舎 3
- 1 1

【氏名】 キム, キョンテ

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100087631

【弁理士】

【氏名又は名称】 滝田 清暉

【選任した代理人】

【識別番号】 100110249

【弁理士】

【氏名又は名称】 下田 昭

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002- 67063

【出願日】 平成14年 3月12日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011017

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013463

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ブラシノステロイド合成に関与する遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (1) 又は (2) の塩基配列から成る遺伝子。

(1) 配列番号 1 の塩基配列

(2) 下記いずれかのタンパク質をコードする塩基配列

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列から成るタンパク質

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりブラシノステロイドの合成を促すタンパク質

【請求項 2】 (1) 又は (2) の塩基配列及び (3) 又は (4) の塩基配列を有するポリヌクレオチド。

(1) 配列番号 1 の塩基配列

(2) 下記いずれかのタンパク質をコードする塩基配列

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列から成るタンパク質

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりブラシノステロイドの合成を促すタンパク質

(3) 配列番号 3 の 5 1 ～ 1 6 2 5 位の塩基配列

(4) 下記いずれかのタンパク質をコードする塩基配列

(c) 配列番号 4 のアミノ酸配列から成るタンパク質

(d) 配列番号 4 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりブラシノステロイドの合成を促すタンパク質

【請求項 3】 プロモーター及び請求項 1 に記載の遺伝子を有し、該遺伝子が該プロモーターに対して順方向に連結されているポリヌクレオチド。

【請求項 4】 プロモーター及び請求項 1 に記載の遺伝子又はその部分配列を有し、該遺伝子又は該部分配列が該プロモーターに対して逆方向に連結されているポリヌクレオチド。

【請求項 5】 プロモーター及び請求項 2 に記載のポリヌクレオチドを有し、該塩基配列のいずれもが該プロモーターに対して順方向に連結されているポリヌクレオチド。

【請求項 6】 プロモーター及び請求項 2 に記載のポリヌクレオチド又はそれらの部分配列を有し、該塩基配列の少なくとも一方又はそれらの部分配列の少なくとも一方が該プロモーターに対して逆方向に連結されているポリヌクレオチド。

【請求項 7】 請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の遺伝子又はポリヌクレオチドを含有するプラスミド。

【請求項 8】 請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の遺伝子又はポリヌクレオチドにより形質転換された植物。

【請求項 9】 請求項 1 に記載の遺伝子又は請求項 2 に記載のポリヌクレオチドにより植物を形質転換し、該遺伝子又は該ポリヌクレオチドを発現させるか又はその発現を抑制することにより、該植物の形態を変化させる方法。

【請求項 1 0】 請求項 3 ～ 6 のいずれか一項に記載の遺伝子又はポリヌクレオチドにより形質転換された植物に前記プロモーターに応じた刺激を与えることにより、該植物の形態を変化させる方法。

【請求項 1 1】 請求項 9 又は 1 0 に記載の方法で形態が変化した植物。

【請求項 1 2】 以下 (a) 又は (b) のタンパク質。

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列から成るタンパク質

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりブラシノステロイドの合成を促すタンパク質

【請求項 1 3】 請求項 1 2 に記載のタンパク質及び (c) 又は (d) のタンパク質から成るタンパク質の混合物又は複合物。

(c) 配列番号 4 のアミノ酸配列から成るタンパク質

(d) 配列番号 4 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりブラシノステロイドの合成を促すタンパク質

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、ブラシノステロイド合成に関与する遺伝子に関し、より詳細には、遺伝子ROT3 (= CYP90C1、配列番号3の51～1625位)と共同してブラシノステロイドの最終合成ステップを司る新規な遺伝子 (CYP90D1、配列番号1) に関する。

【0002】

【従来の技術】

ブラシノステロイドは、植物界に広く分布し、極低濃度で細胞伸張や細胞分裂などの生理作用を示す植物ホルモンであり、40種以上の類縁体の総称である。

植物におけるブラシノステロイドの作用は極めて強く、さまざまな農業適応用の価値の高さが指摘され、関連特許も多数公開されている (例: 特開平5-222090、特開平6-98648、特開平6-340689、特開平8-59408、特開平8-81310、特開平8-113503、特開平9-97など)。

【0003】

ブラシノステロイドの生合成に関する研究も精力的に行われており、その合成経路についても解明が進んでおり (例えば、細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ10「植物ホルモンのシグナル伝達」p180-189秀潤社 (1998.8) 藤岡ら「ブラシノステロイドの生合成と情報伝達」)、ブラシノステロイドの植物体内での合成系はシトクロムP450型蛋白質が司ることが示されている。

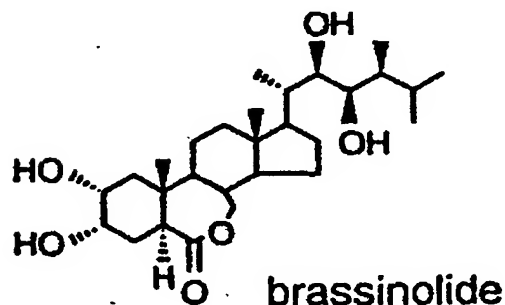
発明者らは、既にシロイヌナズナにおいて、シトクロムP450ファミリーに属するROTUNDIFOLIA3 (ROT3) 遺伝子を特定し (Gene & Development 12:2381-2391 (1998))、このROT3の発現を制御することにより葉や花の形状を変化させることができることを示した (Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 96, pp. 9433-9437 (1999))。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

上記のように、ブラシノステロイドの合成に関与するシトクロムp450型タンパク質をコードする核酸分子等が特定されているが（特表2000-508524）、これまで知られていた合成系の核酸分子の働きは、ブラシノステロイド合成系の比較的初期段階を司るものであったため、その作用を器官特異的にあるいは量的に調節できるような形で利用することは困難であった。更に、ブラシノステロイドの合成の最終的な合成ステップを司る最も重要な合成酵素蛋白質とそれをコードする核酸分子については不明であった。ここで最終的ステップとはcasteroneからブラシノイド（brassinolide、化1）を合成するステップである（ブラシノステロイドの全合成系については図1に示す。）。

【化1】



【0005】

【課題を解決するための手段及び発明の実施の形態】

本発明者らは、既に見出していた遺伝子ROT3 (= CYP90C1、配列番号3の51～1625位、ACCESSION No. AB008097) について相同性検索を行い、51%相同の塩基配列を見出し、この配列を検討した結果、この配列が、植物体のサイズの制御など生理作用を有するブラシノステロイドの合成ステップを司る因子をコードする新規な遺伝子（CYP90D1、配列番号1）であることを見出した。更に、発明者らは、この遺伝子CYP90D1が遺伝子ROT3 (= CYP90C1) と共同してブラシノステロイドの最終合成ステップを司っているということを見出し、本発明を完成させるに至った。

本発明では、生理活性を実際に示すブラシノステロイド合成系を、これらROT3 (= CYP90C1) 及びCYP90D1により制御することを可能とする点で、従来法とは一線を画す。

【 0 0 0 6 】

即ち、単独のROT3 (= CYP90C1)を植物体全体で発現させると葉及び花器官でのみ効果を発揮し、しかも縦軸方向のみに効果を及ぼすことが判明している。花器官とは葉が変形したものであり、遺伝子による形態制御の形態に共通性がある。

しかし、ROT3 (= CYP90C1)をCYP90D1と組みあわせると、植物体全体に作用する。これらROT3 (= CYP90C1)及びCYP90D1の核酸分子及びこれのコードするタンパク質を人為的に操作することで、花や葉の形状を意図したとおりに同時に変形させることも、また植物体の背丈や葉の形状をほとんど変えることなく、花の形状のみを変えることもできる。

【 0 0 0 7 】

即ち、本発明は、(A) (1) 又は (2) の塩基配列から成る遺伝子である。

(1) 配列番号 1 の塩基配列

(2) 下記いずれかのタンパク質をコードする塩基配列

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列から成るタンパク質

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりブラシノステロイドの合成を促すタンパク質

本発明は更に、(B) (1) 又は (2) の塩基配列及び (3) 又は (4) の塩基配列を有するポリヌクレオチドである。

(1) 配列番号 1 の塩基配列

(2) 下記いずれかのタンパク質をコードする塩基配列

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列から成るタンパク質

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりブラシノステロイドの合成を促すタンパク質

(3) 配列番号 3 の 5 1 ~ 1 6 2 5 位の塩基配列

(4) 下記いずれかのタンパク質をコードする塩基配列

(c) 配列番号 4 のアミノ酸配列から成るタンパク質

(d) 配列番号 4 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、

置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりブラシノステロイドの合成を促すタンパク質

【 0 0 0 8 】

また本発明は、i)プロモーター及び上記(A)の遺伝子を有し、該遺伝子が該プロモーターに対して順方向に連結されているポリヌクレオチド、ii)プロモーター及び上記(A)の遺伝子又はその部分配列を有し、該遺伝子又は該部分配列が該プロモーターに対して逆方向に連結されているポリヌクレオチド、iii)プロモーター及び上記(B)のポリヌクレオチドを有し、該塩基配列のいずれもが該プロモーターに対して順方向に連結されているポリヌクレオチド、又はiv)プロモーター及び上記(B)のポリヌクレオチド又はそれらの部分配列を有し、該塩基配列の少なくとも一方又はそれらの部分配列の少なくとも一方が該プロモーターに対して逆方向に連結されているポリヌクレオチドである。

ここで用いるプロモーターとしては、詳細は後述するが、カリフラワーモザイクウィルスの 35S プロモーター・熱ショックプロモーター・化学物質誘導性プロモーター等が挙げられる。またプロモーター及び上記遺伝子の結合方法に特に制限は無く、通常の遺伝子工学的手法に従って適宜行うことができる。

【 0 0 0 9 】

更に本発明は、上記のいずれかの遺伝子又はポリヌクレオチドを含有するプラスミドであり、上記のいずれかの遺伝子又はポリヌクレオチドにより形質転換された植物である。

更に、本発明は、このポリヌクレオチドを含有するプラスミドである。ここで用いるプラスミドとして、TiプラスミドのpBI-121プラスミド等のバイナリーベクターが挙げられる。

また、本発明の適用できる植物は、種子植物全般である。

このような植物を形質転換するには、通常の遺伝子工学的手法を用いて、本発明の遺伝子を上記プラスミドに挿入し、上記植物を形質転換することができる。

【 0 0 1 0 】

また、本発明は、上記(A)の遺伝子又は上記(B)のポリヌクレオチドにより植物を形質転換し、該遺伝子又は該ポリヌクレオチドを発現させるか又はその

発現を抑制することにより、該植物の形態を変化させる方法であり、更に、上記のいずれかの遺伝子又はポリヌクレオチドにより形質転換された植物に前記プロモーターに応じた刺激を与えることにより、該植物の形態を変化させる方法であり、これらのいずれかの方法で形態が変化した植物である。

【 0 0 1 1 】

本発明は、また、以下 (a) 又は (b) のタンパク質である。

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列から成るタンパク質

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりブラシノステロイドの合成を促すタンパク質

更に、本発明は、このタンパク質及び (c) 又は (d) のタンパク質から成るタンパク質の混合物又は複合物である。

(c) 配列番号 4 のアミノ酸配列から成るタンパク質

(d) 配列番号 4 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつその発現によりブラシノステロイドの合成を促すタンパク質

【 0 0 1 2 】

CYP90D1 及び ROT3 (= CYP90C1) の核酸分子及びこれのコードするタンパク質は、以下のような操作により、人為的に操作することができる。

(1) 人為的に操作可能なプロモータに CYP90D1 (配列番号 1) 及び ROT3 (= CYP90C1、配列番号 3 の 51 ~ 1625 位) の核酸分子を結合させたものを、適宜 T i プラスミド等の公知手段を用いて、植物に導入し、外的刺激をプロモータに与え、これら遺伝子の発現をコントロールする。ここで使用できるプロモーターの例として以下のものが挙げられる。

- ・ 35S プロモータ (構成的に発現できる。)
- ・ 熱ショックプロモータ (温度依存的に発現できる。)
- ・ Dex 誘導性プロモータ (デキサメタゾンを投与することで発現をコントロールできる。)
- ・ ペチュニア CHS-A プロモータ (花卉の着色する性質の植物においては花卉特

異的発現、シロイヌナズナなどでは花卉特異的発現をしないが、糖を投与することとで茎葉で発現できる。)

等が挙げられるが、その他、植物の分野で公知の使用可能なプロモータを用いてもよい。

【 0 0 1 3 】

(2) ROT3あるいはCYP90D1の機能を抑える方法：

アンチセンスRNA法（本来の向きと正反対に遺伝子領域を読むように改変した遺伝子を導入する方法）やRNAi法（遺伝子領域の一部を正逆タンデムにつないだものをつくり、これをまとめて読むように改変した遺伝子を導入する方法）により、特定の遺伝子の機能を抑えることができる。本発明において、この方法により遺伝子発現を抑えることができる。いずれの場合も、標的となる遺伝子配列（CYP90D1（配列番号1）及びROT3（= CYP90C1、配列番号3の51～1625位））が分かっているため、ねらい打ちができる。

【 0 0 1 4 】

(3) 組み合わせる方法：

古典遺伝学的に、それぞれ遺伝子（CYP90D1（配列番号1）及びROT3（= CYP90C1、配列番号3の51～1625位））の改変株を作っておき、それらの間で掛け合わせによって作る方法と、直接遺伝子導入をまとめて行なう方法とが可能で

す。

(4) 前駆体発酵方法：

ブラシノステロイド合成系のうち、これまで知られてきた遺伝子の少なくとも一部の遺伝子では、酵母菌で発現させたときに、実際に酵素活性を示した、という成功例がある。このような方法により、ROT3及びCYP90D1の組み合わせ、又はそれぞれを酵母菌など真核細胞で発現させておいて、そこに前駆体を与えることでカステステロンあるいはブラシノライド（最終産物で、かつ活性物質）を人工合成する。

【 0 0 1 5 】

【発明の効果】

従来の、植物に顕著な生理作用を有するステロイド化合物の合成ステップ制御

に関する発明は、いくつか実用面で問題点を有していた。

即ち、従来解明されていたブラシノステロイド合成系の制御因子は、合成系の早期ステップに関するものであったため、例えばその合成系をトランスジェニック植物において強発現させると、植物体全体が徒長し、大型化する。これは特殊な用途以外には、実際には利用価値がなかった。逆にその合成系をトランスジェニック植物系を使ってストップさせると、植物体全体が著しく小型化し、これも特殊な用途以外には、実際には利用価値がなかった。即ち、従来法によって植物体全体が変化してしまうこと、しかもその変化が価値の低いものであることが問題である。実際に応用的に利用価値のあるトランスジェニック植物とは、例えば花卉園芸上では花だけが大きい、あるいは葉のみが小さいものであり、蔬菜改良についていえば、葉のみが大きい、といったものである。そのためには、従来法に関しては、特殊な発現調節システム等を組み合わせないかぎり解決が困難であった。しかし、本発明の示すように、ROT3 (= CYP90C1) と CYP90D1 を共同して用いることにより、特定の器官のみ特定の方向（特に、縦方向）へのサイズの制御や植物体全体のサイズの制御も可能になった。

【0016】

また、本発明において、ROT3 (= CYP90C1) 及び CYP90D1 が共同して最終ステップを支配していることを解明した。そのため、ブラシノステロイドの化学合成系として利用した様々な工業的利用が可能になる。

【0017】

【実施例】

以下、実施例にて本発明を例証するが、本発明を限定することを意図するものではない。

製造例 1

ROT3 の機能抑制には、ROT3 遺伝子の機能欠損型変異体 rot3-1 (Tsuge et al. Development 122: 1589-1600 (1996) に報告した株) を用いた。これを常法により無菌は種の後、23 度恒温条件で培養した。

【0018】

製造例 2

一方、ROT3及びCYP90D1の両方の機能抑制には、まずROT3homolog (CYP90D1)を特異的に増幅するプライマーセット

ROT3h-cDNA-for:5'-GTTAAAACACTAATGGACAC-3' (配列番号5)

ROT3h-cDNA-rev:5'-TGATTATATTCTTTTGATCC-3' (配列番号6)

によりCYP90D1のcDNA (配列番号1) をシロイヌナズナから単離した。一方、汎用ベクターpBI121にハイグロマイシン耐性遺伝子を選択マーカーを加え、更にその中のGUSタンパクコード領域を取り除き、そこに前述のCYP90D1 (配列番号1) のクローンを、本来と逆向きにCauliflower mosaic Virus 35Sプロモーターで読まれるように組み込んだ。これをアグロバクター (C58C1 Rif-resistant) に導入し、常法に従い培養懸濁液を用いて、in planta法によりシロイヌナズナrot3-1変異体に導入した。その形質転換体をハイグロマイシンで選抜の上、自家受粉により導入遺伝子がホモに入っている個体を作出した。常法により無菌は種の後、23度恒明条件で培養した。

【0019】

実施例 1

シロイヌナズナの野生株 (Ws-2)、製造例1の株 (ROT3の機能抑制) 及び製造例2で作製した株 (ROT3及びCYP90D1の機能抑制) を同条件で栽培した葉の形状を図2に示す。

ROT3 (図2-2) の機能抑制したものは、野生株 (図2-1) と比べ葉が縦方向にのみ縮まっているのに対し、ROT3及びCYP90D1の両方の機能抑制したもの (図2-3及び4) は、これらに比べ顕著に葉が縮まっている。即ち、ROT3とCYP90D1とは共同してブラシノステロイドの合成を司る遺伝子であることが分かる。

【0020】

実施例 2

製造例2で作製したROT3及びCYP90D1の機能不全の株を、種子から無菌培養した。培地は2%(w/v)のスクロース入りMS培地 (0.2% ゲルライトで固化) を使い、常法により無菌は種の後、23度恒明条件で培養した。

一方、ブラシノステロイド合成系中間体 (6-D-C T : 6-Deoxocathasterone、6-D-T E : 6-Deoxoteasterone、6-D-3 D T : 3-Dehydro-6-deoxotea

sterone、6-D-TY : 6-Deoxytyphasterol、6-D-CS : 6-Deoxocastasterone、CT : Cathasterone、TE : Teasterone、3DT : 3-Dehydroteasterone、TY : Typhasterol、CS : Castasterone) 及びブラシノライド (BL)。(BLは和光純薬より購入(富士化学工業製)、その他のブラシノステロイドは理研・藤岡昭三博士及び上越教育大・高津戸秀博士より分与された。)のそれぞれの水溶液(濃度0.1 μ M/1)を用意した。

【0021】

これらの水溶液に上記植物(ROT3及びCY090D1の機能不全の株)が水没するようにして、ゆっくりと振盪培養した。葉柄の処理の場合は、植物を無菌的に取り出し、メスにより葉柄を切り出して、同様の処理を行った。それらの葉の写真を図3に示す。

図3より、ROT3及びCY090D1の両遺伝子の機能欠失体に対し、ブラシノステロイド各誘導中間体は効果を示さないが、最終生産物であるブラシノライド(BL)を与えたものは葉が大きく、顕著な効果を示した。即ち、ブラシノステロイドの合成ステップの最終生成物であるブラシノライドの合成をROT3とCYP90D1とが共同で支配していることがわかる。

【0022】

実施例 3

シロイヌナズナの野生株(Ws-2)、製造例1で作製した株(ROT3の機能抑制、rot3-1とrot3-5)及び製造例3で作製した株(ROT3及びCYP90D1の機能抑制、rot3/CYP90D1)における各ブラシノステロイドの量を測定した。この量は、植物体のロゼット時期に地上部を刈り取り、凍結乾燥の後、HPLC及びGC-MSを用いて測定した。その結果を表1に示す。

【表 1】

	ng/g			
	Ws-2	rot3-1	rot3-5	rot3/CYP90D1
6-Deoxoteasterone	0.05	0.19	0.11	0.26
3-Deoxytyphasterol	2.30	3.49	4.30	0.38
6-Deoxocastasterone	2.60	1.88	4.00	0.034
Teasterone	—	0.004	0.02	—
Typhasterol	0.27	0.38	0.46	0.014
Castasterone	0.28	0.31	0.50	0.020
Brassinolide	0.20	0.04	0.06	—

注：表中（—）で示したところは、測定限界(0.001ng/g)以下であったことを示す。

ROT3を抑制したものは（rot3-1及びrot3-5）、ブラシノライドの生成を顕著に抑制し、その結果それ以前のブラシノステロイド（特に、Castasterone）の生成量が上昇していることがわかる。しかし、ROT3の抑制によりブラシノライドの生成を完全に止めるに至っていない。即ち、rot3はそれのみではブラシノライドの生成を完全に制御しているわけではないことも同時に示されている。

一方、ROT3及びCYP90D1の機能抑制したものについては、ブラシノステロイドの合成系のなかでブラシノライド（brassinolide）の量が極端に減少しており、ROT3及びCYP90D1の両者の機能を抑制すると、castasteroneからブラシノライド（brassinolide）への合成が完全に抑制されることがわかる。即ち、ROT3とCYP90D1とが共存することによって初めてブラシノライドの生成を完全に制御していることが示されている。

【0023】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> ブラシノステロイド合成に参与する遺伝子

<130> PS02-1204

<160> 6

<210> 1

<211> 1473

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 1

```

atggacactt cttcttcact tttgttcttc tccttcttct tctttatcat catcgtcac 60
ttcaacaaga tcaacgggtct cagatcatcc ccagcttcaa agaaaaaact taatgatcat 120
catgttacat cccagagtca cggaccaaaag tttccacacg gaagcttggg atggcccgtc 180
atcggtgaaa ccatcgagtt cgtctcttct gcttactcag accgtcctga gagtttcatg 240
gacaagcgtc gtctcatgta tgggagagtg ttttaagtcgc atatttttgg aacggcgacg 300
atcgtgtcga cggatgctga agtgaacaga gccgttttac agagcgactc gacagctttc 360
gtgccgtttt acccaaaaac ggtaagggag ctaatgggaa aatcgtcgat acttcttacc 420
aacgggagtt tacatagacg gttccatgga ttagtcgggt ctttcttaaa gtcgccactt 480
ctcaaagctc aaatcgtag agacatgcac aagtttttgt cggaatccat ggatctatgg 540
tccgaggacc aacctgtgct cctccaagac gtctccaaga ctgttgcat caaagtactt 600
gccaaggcat tgataagtgt agagaaagga gaagatttag aagagctaaa gagagagttt 660
gaaaatttca tatcaggact catgtcatta ccaattaact tccctggaac gcaactccat 720
agatctctcc aagctaagaa gaatatgggtg aagcaagttg aaagaatcat agaaggcaaa 780
attaggaaaa caaagaacaa ggaggaagat gatgttattg caaaggatgt tgtggatgtg 840
ttgcttaagg actcaagtga acatttaact cacaatttga ttgctaacaa tatgatcgac 900
atgatgatcc ctggccacga ttctgtccct gtcctcatta cccttgccgt caaatcctc 960
tctgattctc ctgctgccct caatctccta acgaaaaaca tgaagctgaa aagtttgaag 1020
gaattgacag gagagccact atattggaat gactacttgt cgttacctt aacacaaaag 1080
gtgattacag agacactgag aatgggaaat gttataattg gagtgatgag aaaggcgatg 1140
aaagatgttg aaataaaagg atatgtgata ccaaaggat ggtgtttctt ggcctatctc 1200
agatcagttc atcttgatga agcttattat gagtctccgt acaaatttaa tccctggaga 1260
tggcaagaaa gggacatgaa cacgagtagt ttcagtcctt ttggaggtgg tcagagattg 1320
tgccctggtc tcgatttggc tcgtcttgaa acttcagttt ttcttcacca tcttgtcact 1380
cgcttcagat ggatagcaga agaagacaca atcataaact tccaacggt gcatatgaag 1440
aacaattac ccatttggat caaaagaata taa 1473

```


<210> 2

<211> 490

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 2

Met Asp Thr Ser Ser Ser Leu Leu Phe Phe Ser Phe Phe Phe Phe Ile

1 5 10 15

Ile Ile Val Ile Phe Asn Lys Ile Asn Gly Leu Arg Ser Ser Pro Ala

20 25 30

Ser Lys Lys Lys Leu Asn Asp His His Val Thr Ser Gln Ser His Gly

35 40 45

Pro Lys Phe Pro His Gly Ser Leu Gly Trp Pro Val Ile Gly Glu Thr

50 55 60

Ile Glu Phe Val Ser Ser Ala Tyr Ser Asp Arg Pro Glu Ser Phe Met

65 70 75 80

Asp Lys Arg Arg Leu Met Tyr Gly Arg Val Phe Lys Ser His Ile Phe

85 90 95

Gly Thr Ala Thr Ile Val Ser Thr Asp Ala Glu Val Asn Arg Ala Val

100 105 110

Leu Gln Ser Asp Ser Thr Ala Phe Val Pro Phe Tyr Pro Lys Thr Val

115 120 125

Arg Glu Leu Met Gly Lys Ser Ser Ile Leu Leu Ile Asn Gly Ser Leu

130 135 140

His Arg Arg Phe His Gly Leu Val Gly Ser Phe Leu Lys Ser Pro Leu

145 150 155 160

Leu Lys Ala Gln Ile Val Arg Asp Met His Lys Phe Leu Ser Glu Ser

165 170 175

Met Asp Leu Trp Ser Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu Gln Asp Val Ser

180 185 190

Lys Thr Val Ala Phe Lys Val Leu Ala Lys Ala Leu Ile Ser Val Glu
 195 200 205
 Lys Gly Glu Asp Leu Glu Glu Leu Lys Arg Glu Phe Glu Asn Phe Ile
 210 215 220
 Ser Gly Leu Met Ser Leu Pro Ile Asn Phe Pro Gly Thr Gln Leu His
 225 230 235 240
 Arg Ser Leu Gln Ala Lys Lys Asn Met Val Lys Gln Val Glu Arg Ile
 245 250 255
 Ile Glu Gly Lys Ile Arg Lys Thr Lys Asn Lys Glu Glu Asp Asp Val
 260 265 270
 Ile Ala Lys Asp Val Val Asp Val Leu Leu Lys Asp Ser Ser Glu His
 275 280 285
 Leu Thr His Asn Leu Ile Ala Asn Asn Met Ile Asp Met Met Ile Pro
 290 295 300
 Gly His Asp Ser Val Pro Val Leu Ile Thr Leu Ala Val Lys Phe Leu
 305 310 315 320
 Ser Asp Ser Pro Ala Ala Leu Asn Leu Leu Thr Lys Asn Met Lys Leu
 325 330 335
 Lys Ser Leu Lys Glu Leu Thr Gly Glu Pro Leu Tyr Trp Asn Asp Tyr
 340 345 350
 Leu Ser Leu Pro Leu Thr Gln Lys Val Ile Thr Glu Thr Leu Arg Met
 355 360 365
 Gly Asn Val Ile Ile Gly Val Met Arg Lys Ala Met Lys Asp Val Glu
 370 375 380
 Ile Lys Gly Tyr Val Ile Pro Lys Gly Trp Cys Phe Leu Ala Tyr Leu
 385 390 395 400
 Arg Ser Val His Leu Asp Glu Ala Tyr Tyr Glu Ser Pro Tyr Lys Phe
 405 410 415
 Asn Pro Trp Arg Trp Gln Glu Arg Asp Met Asn Thr Ser Ser Phe Ser

420 425 430
 Pro Phe Gly Gly Gly Gln Arg Leu Cys Pro Gly Leu Asp Leu Ala Arg
 435 440 445
 Leu Glu Thr Ser Val Phe Leu His His Leu Val Thr Arg Phe Arg Trp
 450 455 460
 Ile Ala Glu Glu Asp Thr Ile Ile Asn Phe Pro Thr Val His Met Lys
 465 470 475 480
 Asn Lys Leu Pro Ile Trp Ile Lys Arg Ile
 485 490

【 0 0 2 4 】

<210> 3

<211> 1934

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

tgtgcttagg catatagtta ttccaagaa accggttta ctgtttacgt atgcaacctc 60
 cggcaagcgc aggacttttc cggtcgccgg aaaatctccc ttggccttat aattacatgg 120
 attatgttgt cgctggtttc ttggttttga cggccggaat acttctccgt ccatggctct 180
 ggtttcgtct acgaaactcg aaaacgaaag atggagatga agaagaagat aatgaggaga 240
 agaagaaggg aatgattcca aacggaagct taggctggcc ggtgatcgga gaaaccctaa 300
 acttcatcgc ttgtggttat tcttctcggc ctgttacctt catggacaaa cgaaagtctt 360
 tatacgggaa agtgttcaaa acgaacataa tagggacacc aatcataata tcaaccgatg 420
 cagaggtgaa taaagtgggt ctccaaaacc atgggaacac attgtccct gcatacccta 480
 aatcaattac ggaactactt ggagaaaact ctattctcag catcaatgga cctcatcaaa 540
 aaaggcttca cacgctcatt ggcgcggttc tcagatctcc tcacctcaaa gaccggatca 600
 ctcgagacat tgaggcctcg gttgttctca ctttggcgtc ttgggctcaa cttccattgg 660
 ttcatgttca ggatgagatc aaaaagatga cgtttgagat attagtaaaa gtgttgatga 720
 gcacatctcc tggatgaagat atgaacattc tcaaacttga gttcgaagaa ttcacaaag 780
 gtttgatttg tatccaatc aaattccctg gcactagact ctacaaatcc ttaaaggcga 840

aagagaggtt aataaagatg gtaaaaaagg ttgtggagga gagacaagtg gcgatgacaa 900
cgacgtctcc ggcaaatgac gtggtggacg tacttctaag agacggtggt gattcagaga 960
agcaatctca accgtcagat ttcgtcagcg gaaagatcgt agagatgatg ataccggag 1020
aggaaacaat gccaacggcg atgaccttgg ctgtcaaatt ctttaagtac aaccccgctg 1080
ctctagccaa actcgtggag gagaatatgg agatgaagag gcgtaaattg gaattgggag 1140
aagaatacaa gtggaccgat tatatgtctc tctcttttac tcaaaatgtg ataaacgaaa 1200
cgcttagaat ggctaacatt attaacgggg tgtggaggaa agctctcaag gatgtagaaa 1260
ttaaaggtta ctttaataccg aaaggatggt gtgtattggc atcattcata tcggttcaca 1320
tggatgaaga cttttatgat aatccctatc aattcgatcc gtggagatgg gacagaatta 1380
atggatcggc aaacagcagt atttgcttca caccctttgg tgggtgggcaa aggctatgtc 1440
ctggttttaga gctgtcgaag ctcgaaatat ccatctttct tcaccacctt gtaaccgggt 1500
acagttggac ggctgaggaa gacgagatag tgtcatttcc gactgtgaag atgaagcgga 1560
ggctcccgat ccgagtggct actgtagatg atagtgttc tccgatctca cttgaagatc 1620
attaatagat catttcaaag aacaaaactg tttgtgcaaa gaggaagcag agaagtaaac 1680
aaatgatctt attaacaaat agtagagaag agaagcaaac aagattggtg ggtaagacag 1740
aaagaacnaa acgtacagct agttagggct caaagatgag agattctaata tataattttt 1800
tttgtttgtc atgtcaaatt ataagcgttg gttaggttgt ccctttctct tttatttattc 1860
gtaccaaacg caagttgaga tatgattcca tatatatgga tgatagatat gtatattaat 1920
atatagcggc cggg 1934

<210> 4

<211> 524

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 4

Met Gln Pro Pro Ala Ser Ala Gly Leu Phe Arg Ser Pro Glu Asn Leu

1

5

10

15

Pro Trp Pro Tyr Asn Tyr Met Asp Tyr Leu Val Ala Gly Phe Leu Val

20

25

30

Leu Thr Ala Gly Ile Leu Leu Arg Pro Trp Leu Trp Phe Arg Leu Arg

35	40	45
Asn Ser Lys Thr Lys Asp Gly Asp Glu Glu Glu Asp Asn Glu Glu Lys		
50	55	60
Lys Lys Gly Met Ile Pro Asn Gly Ser Leu Gly Trp Pro Val Ile Gly		
65	70	75
Glu Thr Leu Asn Phe Ile Ala Cys Gly Tyr Ser Ser Arg Pro Val Thr		
85	90	95
Phe Met Asp Lys Arg Lys Ser Leu Tyr Gly Lys Val Phe Lys Thr Asn		
100	105	110
Ile Ile Gly Thr Pro Ile Ile Ile Ser Thr Asp Ala Glu Val Asn Lys		
115	120	125
Val Val Leu Gln Asn His Gly Asn Thr Phe Val Pro Ala Tyr Pro Lys		
130	135	140
Ser Ile Thr Glu Leu Leu Gly Glu Asn Ser Ile Leu Ser Ile Asn Gly		
145	150	155
Pro His Gln Lys Arg Leu His Thr Leu Ile Gly Ala Phe Leu Arg Ser		
165	170	175
Pro His Leu Lys Asp Arg Ile Thr Arg Asp Ile Glu Ala Ser Val Val		
180	185	190
Leu Thr Leu Ala Ser Trp Ala Gln Leu Pro Leu Val His Val Gln Asp		
195	200	205
Glu Ile Lys Lys Met Thr Phe Glu Ile Leu Val Lys Val Leu Met Ser		
210	215	220
Thr Ser Pro Gly Glu Asp Met Asn Ile Leu Lys Leu Glu Phe Glu Glu		
225	230	235
Phe Ile Lys Gly Leu Ile Cys Ile Pro Ile Lys Phe Pro Gly Thr Arg		
245	250	255
Leu Tyr Lys Ser Leu Lys Ala Lys Glu Arg Leu Ile Lys Met Val Lys		
260	265	270

Lys Val Val Glu Glu Arg Gln Val Ala Met Thr Thr Thr Ser Pro Ala
 275 280 285
 Asn Asp Val Val Asp Val Leu Leu Arg Asp Gly Gly Asp Ser Glu Lys
 290 295 300
 Gln Ser Gln Pro Ser Asp Phe Val Ser Gly Lys Ile Val Glu Met Met
 305 310 315 320
 Ile Pro Gly Glu Glu Thr Met Pro Thr Ala Met Thr Leu Ala Val Lys
 325 330 335
 Phe Leu Ser Asp Asn Pro Val Ala Leu Ala Lys Leu Val Glu Glu Asn
 340 345 350
 Met Glu Met Lys Arg Arg Lys Leu Glu Leu Gly Glu Glu Tyr Lys Trp
 355 360 365
 Thr Asp Tyr Met Ser Leu Ser Phe Thr Gln Asn Val Ile Asn Glu Thr
 370 375 380
 Leu Arg Met Ala Asn Ile Ile Asn Gly Val Trp Arg Lys Ala Leu Lys
 385 390 395 400
 Asp Val Glu Ile Lys Gly Tyr Leu Ile Pro Lys Gly Trp Cys Val Leu
 405 410 415
 Ala Ser Phe Ile Ser Val His Met Asp Glu Asp Ile Tyr Asp Asn Pro
 420 425 430
 Tyr Gln Phe Asp Pro Trp Arg Trp Asp Arg Ile Asn Gly Ser Ala Asn
 435 440 445
 Ser Ser Ile Cys Phe Thr Pro Phe Gly Gly Gly Gln Arg Leu Cys Pro
 450 455 460
 Gly Leu Glu Leu Ser Lys Leu Glu Ile Ser Ile Phe Leu His His Leu
 465 470 475 480
 Val Thr Arg Tyr Ser Trp Thr Ala Glu Glu Asp Glu Ile Val Ser Phe
 485 490 495
 Pro Thr Val Lys Met Lys Arg Arg Leu Pro Ile Arg Val Ala Thr Val

500

505

510

Asp Asp Ser Ala Ser Pro Ile Ser Leu Glu Asp His

515

520

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 5

gttaaaacac taatggacac

20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 6

tgatttatat tcttttgatc c

21

【図面の簡単な説明】

【図 1】

ブラシノステロイドの全合成系を示す図である。

【図 2】

シロイズナズナの野生株 (W s - 2) (N o. 1)、製造例 1 の株 (ROT3 の機能抑制) (N o. 2)、及び製造例 2 で作製した株 (ROT3 及び CYP90D1 の機能抑制) (N o. 3 及び 4) を同条件で栽培した葉の形状を示す図である。N o. 3 は効果がやや弱い株、N o. 4 は効果が強く出た株である。

【図 3】

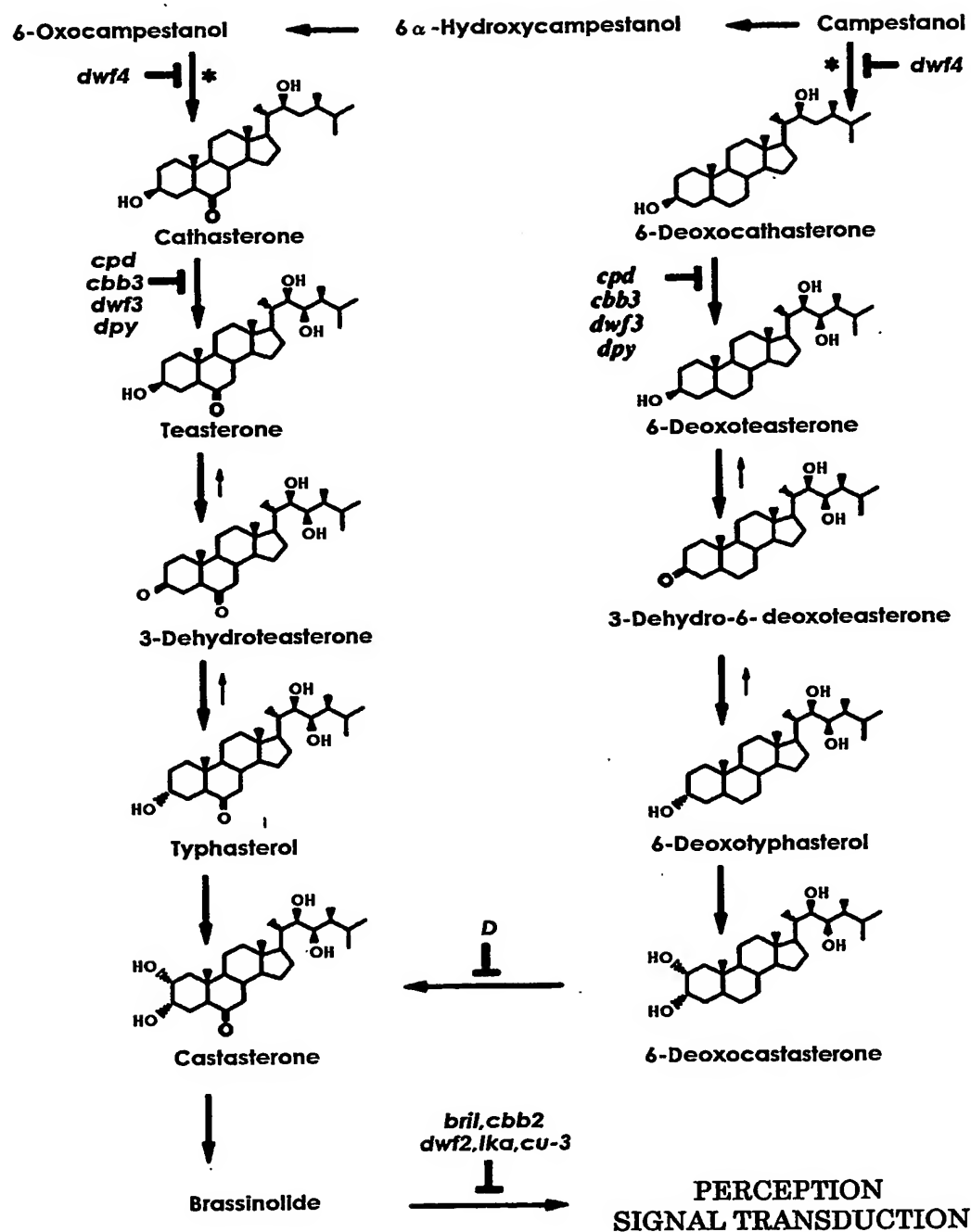
ROT3 及び CY090D1 の機能不全の株にブラシノステロイド合成系中間体及びブラシノライドを投与した後の葉の形状を示す図である。C o n t r o l : 何も投与しない、6 - D - C T : 6-Deoxocathasterone を投与 (以下同じ。)、6 - D - T E : 6-Deoxoteasterone、6 - D - 3 D T : 3-Dehydro-6-deoxoteasterone、6 - D - T Y : 6-Deoxotyphasterol、6 - D - C S : 6-Deoxocastasterone、C T : C

特 2 0 0 2 - 2 4 8 9 1 0

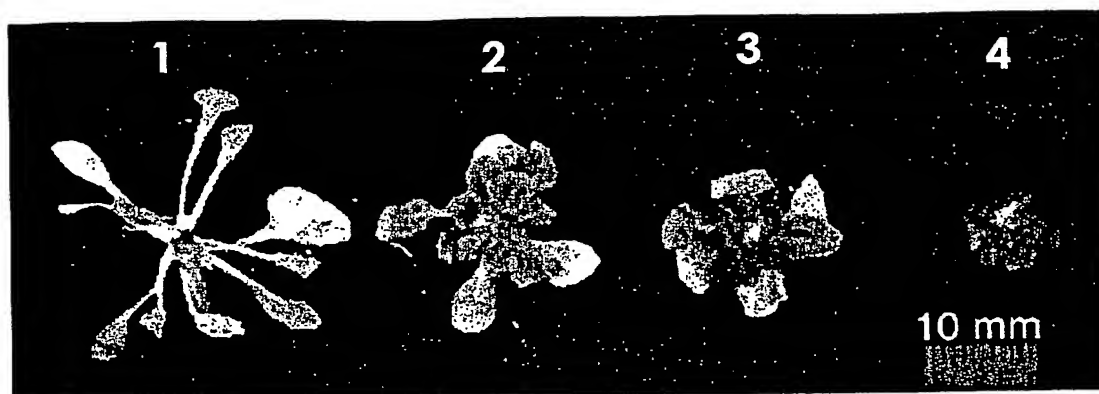
athasterone、 T E : Teasterone、 3 D T : 3-Dehydroteasterone、 T Y : Typhas
terol、 C S : Castasterone、 B L : Brassinolide

【書類名】 図面

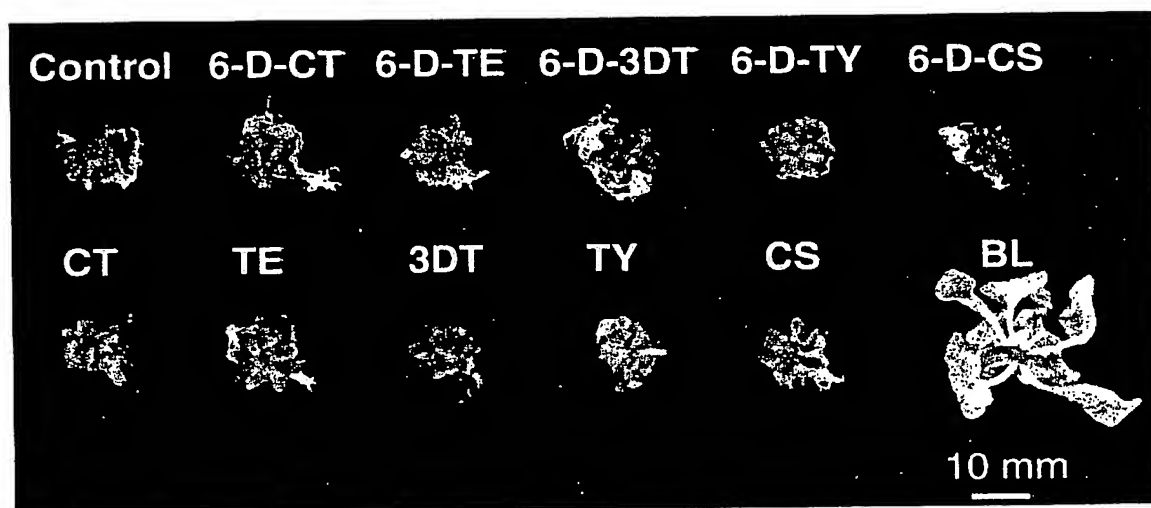
【図 1】



【図2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ブラシノステロイドは、植物界に広く分布し、極低濃度で細胞伸張や細胞分裂などの生理作用を示す植物ホルモンであるが、その合成の最終的な合成ステップを司る最も重要な合成酵素蛋白質とそれをコードする核酸分子については不明であった。

【解決手段】 既に見出していた遺伝子ROT3 (= CYP90C1、配列番号3の51～1625位、ACCESSION No.AB008097)について相同性検索を行い、51%相同の塩基配列を見出し、この配列を検討した結果、この配列が、植物体のサイズの制御など生理作用を有するブラシノステロイドの合成ステップを司る因子をコードする新規な遺伝子(CYP90D1、配列番号1)であり、更に、発明者らは、この遺伝子CYP90D1が遺伝子ROT3 (= CYP90C1)と共同してブラシノステロイドの最終合成ステップを司っているということを見出した。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-248910
受付番号	50201279436
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成14年 9月 2日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年 8月28日

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【住所又は居所】 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】 申請人

【識別番号】 100087631

【住所又は居所】 東京都新宿区歌舞伎町2丁目41番12号 岡埜
ビル7階 滝田・下田技術特許事務所

【氏名又は名称】 滝田 清暉

【選任した代理人】

【識別番号】 100110249

【住所又は居所】 東京都新宿区歌舞伎町2丁目41番地12号 岡
埜ビル7階 滝田・下田技術特許事務所

【氏名又は名称】 下田 昭

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日	1998年 2月24日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	科学技術振興事業団

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.